

Enhanced English Abstract for EP1191106

1 / 1 WPAT - ©The Thomson Corp. - image

Derwent Accession :

2002-385304 [42]

CPI Accession :

C2002-108640

Title :

New tetrazolyl- and triazolyl-L-alanine and S-heteroaryl-L-cysteine compounds and other non-proteinogenic L-amino-acids, useful in synthesis, e.g. of pharmaceutical or agrochemical agent, are produced by fermentation

Derwent Class :

B05 D16 E19

Patent Assignee :

(CONE) CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND GMBH

(ELEC) ELECTRO CHEM IND GMBH INT

Inventor :

MAIER T; MAYER T; MELL T

Nbr of Patents :

26

Nbr of Countries :

39

Patent Number :

EP1191106 A1 20020327 DW2002-42 Eng 19p *

AP: 2001EP-0120750 20010906

AU200175562 A 20020328 DW2002-42 Eng

AP: 2001AU-0075562 20010920

BR200104188 A 20020507 DW2002-42 Por

AP: 2001BR-0004188 20010921

CA2357469 A1 20020321 DW2002-42 Eng

AP: 2001CA-2357469 20010919

DE10046934 A1 20020418 DW2002-42 Ger

AP: 2000DE-1046934 20000921

SK200101348 A3 20020404 DW2002-42 Slo

AP: 2001SK-0001348 20010921

US20020039767 A1 20020404 DW2002-42 Eng

AP: 2001US-0957961 20010921

CN1344801 A 20020417 DW2002-48 C12P-013/04 Chi

AP: 2001CN-0142225 20010921

JP2002165598 A 20020611 DW2002-53 Jpn 10p

AP: 2001JP-0283510 20010918

KR2002023130 A 20020328 DW2002-65 C12P-013/04 Kor

AP: 2001KR-0057922 20010919

ZA200107763 A 20020731 DW2002-71 Eng 26p

AP: 2001ZA-0007763 20010920

AU-758402 B 20030320 DW2003-29 Eng

FD: Previous Publ AU200175562 A

AP: 2001AU-0075562 20010920

MX2001009508 A1 20030501 DW2004-15 Spa

AP: 2001MX-0009508 20010920

EP1191106 B1 20040428 DW2004-29 Ger
AP: 2001EP-0120750 20010906

DE50102109 G 20040603 DW2004-36 C12P-013/04 Ger
FD: Based on EP1191106 A
AP: 2001DE-5002109 20010906, 2001EP-0120750 20010906

RU2226550 C2 20040410 DW2004-36 Rus
AP: 2001RU-0125710 20010920

US6756216 B2 20040629 DW2004-43 Eng
AP: 2001US-0957961 20010921

US20040197879 A1 20041007 DW2004-66 Eng
FD: Div ex US6756216 B
AP: 2004US-0833569 20040428, Div Ex 2001US-0957961 20010921

ES2220639 T3 20041216 DW2005-06 Spa
FD: Based on EP1191106 A
AP: 2001EP-0120750 20010906

KR-475985 B 20050310 DW2005-51 C12P-013/04 Kor
FD: Previous Publ KR2002023130 A
AP: 2001KR-0057922 20010919

US6939967 B2 20050906 DW2005-58 Eng
FD: Div ex US6756216 B
AP: 2004US-0833569 20040428, Div Ex 2001US-0957961 20010921

US20050222426 A1 20051006 DW2005-66 Eng
FD: Div ex US6756216 B
AP: 2005US-0130955 20050517, Div Ex 2001US-0957961 20010921, Div Ex
2004US-0833569 20040428

HU200103764 A1 20060130 DW2006-13 Hun
AP: 2001HU-0003764 20010920

US7015331 B2 20060321 DW2006-21 Eng
FD: Div ex US6756216 B, Div ex US6939967 B
AP: 2005US-0130955 20050517, Div Ex 2001US-0957961 20010921, Div Ex
2004US-0833569 20040428

CN1250735C C 20060412 DW2006-61 C12P-013/00 Chi
AP: 2001CN-0142225 20010921

TW-258507 B1 20060721 DW2007-29 C12P-013/04 Chi
AP: 2001TW-0123402 20010921

Priority Number :
2000DE-1046934 20000921; 2001EP-0120750 20010906

Intl Patent Class :
C12P-013/04; C07D-213/04; C07D-275/02; C07D-275/04; C07D-333/06;
C07D-233/61; C07D-249/04; C07D-249/08; C07D-249/18; C07D-257/04;
C12P-013/06; C12P-013/12; C07D-213/62; C07D-213/70; C07D-233/18;
C07D-233/84; C07D-239/38; C07D-249/16; C07D-263/58; C07D-271/07;
C07D-277/26; C07D-277/70; C07D-333/18; C07D-333/24; C07D-333/34;
C07D-521/00; C12R-001/19; C07D-249/00; C12P-013/00; C07D-213/00;
C07D-233/00; C07D-239/00; C07D-257/00; C07D-263/00; C07D-271/00;
C07D-277/00; C07D-333/00

Advanced IPC (V8) :
C07D-249/18 [2006-01 A F I B - -]; C12P-013/04 [2006-01 A F I B - -];
C07D-213/62 [2006-01 A - I R - -]; C07D-213/70 [2006-01 A L I R - -];

C07D-233/18 [2006-01 A - I R - -]; C07D-233/61 [2006-01 A - I R - -];
C07D-233/84 [2006-01 A L I R - -]; C07D-239/38 [2006-01 A - I R - -];
C07D-249/04 [2006-01 A - I R - -]; C07D-249/08 [2006-01 A L I R - -];
C07D-249/16 [2006-01 A - I R - -]; C07D-249/18 [2006-01 A - I R - -];
C07D-257/04 [2006-01 A - I R - -]; C07D-263/58 [2006-01 A - I R - -];
C07D-271/07 [2006-01 A - I R - -]; C07D-277/26 [2006-01 A L I R - -];
C07D-277/70 [2006-01 A - I R - -]; C07D-333/18 [2006-01 A L I R - -];
C07D-333/24 [2006-01 A - I R - -]; C07D-333/34 [2006-01 A - I R - -];
C07D-521/00 [2006-01 A - I R - -]; C12P-013/04 [2006-01 A - I R - -];
C12P-013/06 [2006-01 A - I R - -]; C12P-013/12 [2006-01 A - I R - -];
C12R-001/19 [2006-01 A L N R - -]

Core IPC (V8) :

C07D-249/00 [2006 C F I B - -]; C12P-013/00 [2006 C F I B - -];
C07D-213/00 [2006 C - I R - -]; C07D-233/00 [2006 C - I R - -];
C07D-239/00 [2006 C - I R - -]; C07D-249/00 [2006 C - I R - -];
C07D-257/00 [2006 C - I R - -]; C07D-263/00 [2006 C - I R - -];
C07D-271/00 [2006 C - I R - -]; C07D-277/00 [2006 C - I R - -];
C07D-333/00 [2006 C - I R - -]; C07D-521/00 [2006 C - I R - -];
C12P-013/00 [2006 C - I R - -]

US Patent Class :

435106000 548267200 548255000 548261000 546300000 544316000 435106000
435113000 435849000 435106000 544335000 546335000 548170000 548200000
548217000 548253000 548261000 548267600 548288500 549076000 548261000
548257000

Designated States :

EP1191106

Regional States: AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV
MC MK NL PT RO SE SI TR

EP1191106

Regional States: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT
SE TR

Abstract :

EP1191106 A

NOVELTY: 1,2,3,4-Tetrazolyl-L-alanine and its derivatives,
1,2,3-triazolyl-L-alanine and its derivatives and
S-heteroaryl-L-cysteines are new.

DESCRIPTION: An INDEPENDENT CLAIM is also included for the production of non-proteinogenic L-amino-acids (I) by direct fermentation of a known strain of microorganism (II) with a deregulated cysteine substance exchange in known manner, in which a nucleophilic compound (III) is added during fermentation in an amount leading to (I) production by (II).

USE: Non-proteinogenic L-amino-acids (I) are of interest e.g. for the production of pharmaceuticals and agrochemical agents of the molecular mimicry type, which imitate the structure of natural amino-acids and hence e.g. cause modulation of natural reactions in receptor interactions. They are also useful in general in synthesis as chiral compounds, within the scope of the chiral pool.

ADVANTAGE: Previously, non-proteinogenic L-amino-acids (I) in enantiomer-pure form have mainly been prepared by costly synthesis, which normally gives only one particular compound. Few processes allow the production of various compounds simply by changing one educt.

Chemical synthesis normally starts from chiral components or necessitates racemate separation. The present process is efficient and allows the production of a series of (I) by direct fermentation.

Manual Codes :

CPI: B06-D05 B06-D08 B06-E01 B06-F01 B07-B01 B07-D04B B07-D08 B07-D09
B07-D12 D05-A04 D05-C01 E06-H E07-H E10-B02D1 E11-M

Update Basic :

2002-42

Update Equiv. :

2002-42; 2002-48; 2002-53; 2002-65; 2002-71; 2003-29; 2004-15; 2004-29;
2004-36; 2004-43; 2004-66; 2005-06; 2005-51; 2005-58; 2005-66; 2006-13;
2006-21; 2006-61; 2007-29

Update Equivalents (Monthly) :

2006-09; 2007-05



(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 191 106 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

(43) Veröffentlichungstag:
27.03.2002 Patentblatt 2002/13

(51) Int Cl.7: C12P 13/04, C12P 13/06,
C12P 13/12, C07D 257/04,
C07D 249/04, C07D 249/08,
C07D 249/18, C07D 275/02,
C07D 275/04, C07D 333/06,
C07D 233/61, C07D 213/04,
C07D 261/20, C07D 239/26

(21) Anmeldenummer: 01120750.3

(22) Anmeldetag: 06.09.2001

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR

Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 21.09.2000 DE 10046934

(71) Anmelder: Consortium für elektrochemische
Industrie GmbH
81379 München (DE)

(72) Erfinder: Maier, Thomas, Dr.
85221 Dachau (DE)

(74) Vertreter: Potten, Holger et al
Wacker-Chemie GmbH
Zentralabteilung Patente,
Marken und Lizenzen
Hanns-Seldel-Platz 4
81737 München (DE)

Bemerkungen:

Das biologische Material ist bei DSMZ unter der
(den) Nummer(n) DSM 13495 hinterlegt worden.

(54) Process for the fermentative preparation of non-proteinogenic L-amino acids

(57) Verfahren zur Herstellung von nicht-proteinogenen L-Aminosäuren durch direkte Fermentation eines an sich bekannten Mikroorganismenstammes mit einem deregulierten Cystein-Stoffwechsel in an sich bekannter Weise, dadurch gekennzeichnet, daß während der Fermentation eine nukleophile Verbindung in derar-

tigen Mengen dem Fermentationsansatz zudosiert wird, daß diese zur Produktion von nicht-proteinogenen L-Aminosäuren durch den Mikroorganismenstamm führt.

EP 1 191 106 A1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von nicht-proteinogenen L-Aminosäuren durch direkte Fermentation von Mikroorganismen sowie nach dem Verfahren erhaltene L-Aminosäuren.

5 [0002] Nicht-proteinogene Aminosäuren sind Aminosäuren, die in der Natur nicht als Bausteine für die Proteinbiosynthese verwendet werden und dadurch klar von den 20 proteinogenen Aminosäuren abgrenzen sind. Es handelt sich vorzugsweise um β -substituierte L-Alanin-Derivate.

[0003] Nicht-proteinogene Aminosäuren stellen interessante Verbindungen z.B. für die Herstellung von Pharma- und Agrarwirkstoffen dar. Sie können als Wirkstoff oder als Teil eines Wirkstoffs in einer Art molekularer MIMIKRY die Struktur 10 von natürlichen Aminosäuren imitieren und dadurch zum Beispiel bei Rezeptor-Interaktionen eine Modulation der natürlichen Reaktion bewirken. Zudem können sie ganz allgemein als chirale Verbindungen im Rahmen des "chiral pool" als Synthesebausteine dienen.

[0004] Bisherige Herstellverfahren für nicht-proteinogene Aminosäuren in enantiomerenreiner Form basieren meist auf aufwendigen Synthesen, die zudem meist nur Zugang zu einer bestimmten Verbindung erlauben. Nur wenige 15 Verfahren ermöglichen durch den einfachen Austausch eines Eduktes die Herstellung verschiedener Verbindungen.

[0005] In den meisten Fällen handelt es sich um chemische Synthesen, die ihrerseits meist schon von chiralen Bausteinen ausgehen oder eine Racematspaltung nach sich ziehen.

[0006] Alternativ sind auch einige enzymatische Verfahren beschrieben. So können mit Hilfe von Transaminasen aus α -Ketosäuren mit L-Glutaminsäure als Amino-Donor verschiedene nicht-proteinogene Aminosäuren hergestellt 20 werden. Ein anderes Verfahren benutzt Hydantoinasen in Kombination mit Carbamoylasen. Enzymatische Verfahren sind jedoch ebenfalls kostenintensiv, da die entsprechenden Enzyme bereitgestellt werden müssen und diese als Katalysatoren nur begrenzte Lebenszeit aufweisen (Rehm et al. Biotechnology 1996; Vol.6, S. 505 - 560).

[0007] Besonders einfach und günstig wären dagegen Verfahren zur Herstellung von nicht-proteinogenen Aminosäuren durch direkte Fermentation von Mikroorganismen. Solche Verfahren bergen jedoch die Gefahr, dass die produzierte nicht-proteinogene Aminosäure mit dem Stoffwechsel der natürlichen Aminosäuren interferiert und es damit 25 zu Wachstumshemmungen kommt. Bisher ist in diesem Themenbereich ein Verfahren zur direkten Fermentation von D-Aminosäuren bekannt (WO98/14602). Diese Anmeldung beschreibt die Herstellung von D-Aminosäuren mittels rekombinanter Mikroorganismen, in die ein D-Aminotransferase Gen und ein L-Aminodeaminase Gen eingebracht wurde. Darüberhinaus beschrieben Saito et al. (Biol. Pharm. Bull. 1997, 20: 47-53) die Produktion der pflanzlichen, nicht- 30 proteinogenen Aminosäure L-Pyrazolylalanin durch Expression von pflanzlichen Genen in Escherichia coli. Die Ausbeuten sind für eine kommerzielle Produktion mit < 1 g/l jedoch zu niedrig und die Kosten beim beschriebenen Einsatz von L-Serin als Edukt sehr hoch.

[0008] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein effizientes Verfahren zur Herstellung einer Reihe von nicht-proteinogenen L-Aminosäuren durch direkte Fermentation zur Verfügung zu stellen.

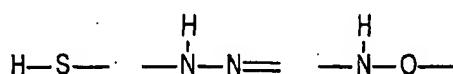
35 [0009] Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß ein an sich bekannter Mikroorganismenstamm mit einem deregulierten Cystein-Stoffwechsel in an sich bekannter Weise fermentiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß während der Fermentation eine nukleophile Verbindung in derartigen Mengen dem Fermentationsansatz zudosiert wird, daß diese zur Produktion von nicht-proteinogenen L-Aminosäuren durch den Mikroorganismenstamm führt.

[0010] Vorzugsweise werden am Ende der Fermentation die nicht-proteinogenen L-Aminosäuren aus dem jeweiligen 40 Fermentationsansatz mittels an sich bekannter Methoden abgetrennt.

[0011] Überraschenderweise wurde gefunden, daß bei der Fermentation von Mikroorganismenstämmen mit dereguliertem Cystein-Stoffwechsel anstelle von Sulfid ein Reihe anderer nukleophiler Verbindungen sehr effizient in den Aminosäurestoffwechsel eingehen und die entsprechenden Reaktionsprodukte ins Kulturmedium sezerniert werden. Vorteilhafterweise kann dabei Glucose als billige Kohlenstoffquelle verwendet werden.

45 [0012] Durch die erfindungsgemäße Zudosierung von nukleophilen Verbindungen während der Fermentation werden demnach nicht-proteinogene L-Aminosäuren gebildet. Vorzugsweise wird daher eine nukleophile Verbindung, die in den Aminosäurestoffwechsel eingeht, während der Fermentation zugegeben.

[0013] Bevorzugt werden nukleophile Verbindungen zugegeben, die einen Rest ausgewählt aus der Gruppe 50



55

umfassen.

[0014] Besonders bevorzugt wird dem Fermentationsansatz eine nukleophile Verbindung ausgewählt aus der folgenden Gruppe zugegeben:

- Thiol der allgemeinen Formel (1):



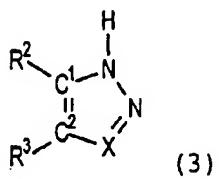
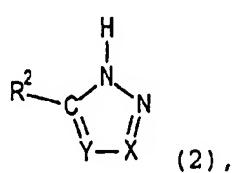
5

wobei R^1 einwertiger substituierter oder nicht substituierter Alkyl-, Alkoxy-, Aryl- oder Heteroarylrest mit maximal 15 C-Atomen bedeutet;

10

- Azol der allgemeinen Formel (2) oder (3):

15



20

sowie deren Ester, Ether oder Salze,
wobei X und Y gleich oder verschieden sind und CR^4 oder N bedeuten und R^4 -H, -COOH, -OH, -NH₂, -NO₂, -SH, -SO₃⁻, -F, -Cl, -Br, -I, C₁-C₅-Alkylcarbonyl- oder R^1 bedeutet und R^1 die zu Formel (1) genannte Bedeutung hat und wobei R^2 und R^3 gleich oder verschieden sind und R^4 bedeuten oder wobei C¹ und C² in Formel (3) anstelle der Substituenten R^2 und R^3 mittels einer Brücke [-CR^aSR^b]_a mit a gleich 1, 2, 3 oder 4 zu einem Ring verknüpft sind, wobei

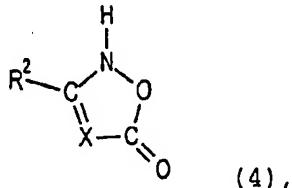
25

R^5 und R^6 gleich oder verschieden sind und R^4 bedeuten und eine oder mehrere nicht benachbarte Gruppen [-CR^aR^b] durch Sauerstoff, Schwefel oder einen ggf. mit C₁-C₅-Alkyl- substituierten Iminorest ersetzt sein können und zwei benachbarte Gruppen [-CR^aR^b] durch eine Gruppe [-CR^a=CR^b] oder durch eine Gruppe [-CR^a=N-] ersetzt sein können.

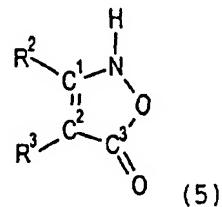
30

- Isoxazolinon der allgemeinen Formel (4) oder (5):

35



40



45

sowie deren Ester, Ether oder Salze,
wobei X, R¹, R² und R³ die bereits genannte Bedeutung haben und
wobei C¹ und C² in Formel (5) anstelle der Substituenten R² und R³ mittels einer wie für Formel (3) definierten Brücke zu einem Ring verknüpft sein kann.

50

[0015] Beispiele für Thiole sind Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe 2-Mercaptoethanol, 3-Mercaptopropanol, 3-Mercaptopropionsäure, 3-Mercapto-1-propansulfonsäure, Mercaptoethansulfonsäure, 2-Mercaptoethylamin, Thioglycolsäure, Thiomilchsäure, Thioessigsäure, Mercaptobernsteinsäure, Mercaptobrenztraubensäure, Dithiothreitol, Dithioerythritol, 1-Thioglycerin, Thiophenol, 4-Fluorthiophenol, 4-Mercaptophenol, p-Thiokresol, 5-Thio-2-nitrobenzoësäure, 2-Mercaptothiazol, 2-Mercaptothiazolin, 2-Mercaptoimidazol, 3-Mercapto-1,2,4-Triazol, 2-Thiophenthiol, 2-Mercaptopyridin, 2-Mercaptopyrimidin, 2-Thiocytosin, 2-Mercaptonicotinsäure, 2-Mercapto-1-methylimidazol, 2-Mercaptobenzothiazol, 2-Mercaptobenzoxazol, 6-Mercaptourin.

55

[0016] Beispiele für Azole sind Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe 1,2-Pyrazol, 3-Methylpyrazol, 4-Methylpyrazol, 3,5-Dimethylpyrazol, 3-Aminopyrazol, 4-Aminopyrazol, Pyrazol-4-carbonsäure, Pyrazol-3,5-dicarbonsäure, 1,2,3-Triazol, 1,2,4-Triazol, 3-Amino-1,2,4-Triazol, 1,2,3,4-Tetrazol, Indazol, Indazol-3-carbonsäure, Indazol-5-carbon-

säure, 5-Aminoindazol, Benzotriazol, Benzotriazol-5-carbonsäure, 5-Aminobenzotriazol, Aminopyrazolopyrimidin, 8-Azaguanin, 8-Azaadenin.

[0017] Beispiele für Isoxazollone sind Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Isoxazolin-2-on, 4-Methylisoxazolin-2-on, 5-Methylisoxazolin-2-on, 4,5-Dimethylisoxazolin-2-on, 1,2,4-Oxadiazolidin-3,5-dion.

5 [0018] Mikroorganismenstämme mit dereguliertem Cystein-Stoffwechsel, die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Sie zeichnen sich durch eine gegenüber dem Wildtyp-Stamm erhöhte endogene Produktion von O-Acetyl-L-Serin - dem unmittelbaren biosynthetischen Vorläufer von L-Cystein - aus. In einem Mikroorganismus wird im letzten Schritt der Cysteinbiosynthese bekanntermaßen durch die Aktivität der O-Acetyl-SerIn-Sulphydylasen die Acetyl-Funktion des O-Acetyl-L-Serins gegen eine Thiol-Funktion 10 ersetzt und damit L-Cystein gebildet. Dieser Reaktionstyp wird als β -Substitution bezeichnet, da am β -Kohlenstoffatom der Aminosäure ein Austausch einer funktionellen Gruppe vorgenommen wird.

10 [0019] Vorzugsweise wird einer der folgenden Mikroorganismenstämme im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt:

15 - Stämme mit modifizierten *cysE*-Allelen wie beispielsweise in WO 97/15673 (hereby incorporated by reference) oder Nakamori S. et al., 1998, Appl. Env. Microbiol. 64: 1607-1611 (hereby incorporated by reference) oder Takagi H. et al., 1999, FEBS Lett. 452: 323-327 beschrieben, oder

- Stämme, die Efflux-Gene enthalten, wie sie beispielsweise in EP 0885962 A1 (entspricht der US Anmeldung mit der Serial Number SN 09/097759 (hereby incorporated by reference)) beschrieben sind, oder

20 - Stämme mit einer geänderten *CysB*-Aktivität wie in der deutschen Patentanmeldung DE 19949579 beschrieben, oder

- Stämme, die unter Einsatz unspezifischer Mutagenese-Methoden kombiniert mit Screening-Methoden für Cystein-Überproduktion oder verminderter Cystein-Abbau gewonnen werden, wie beispielsweise in WO 97/15673 oder in Nakamori S. et al., 1998, Appl. Env. Microbiol. 64:1607-1611 beschrieben.

25 [0020] Solche Stämme zeichnen sich dadurch aus, daß sie bei ausreichender Zuführung einer anorganischen Schwefel-Quelle wie z.B. Sulfat oder Thiosulfat signifikante Mengen an L-Cystein oder eines Derivates davon in das Kulturmödium sezernieren. Durch die erfindungsgemäße Zudosierung einer nukleophilen Verbindung während der Fermentation geht diese Verbindung in die β -Substitution ein und führt dadurch zur Produktion von nicht-proteinogenen L-Aminosäuren.

30 [0021] Mit Mikroorganismenstämmen, die keinen deregulierten Cystein-Stoffwechsel besitzen (z.B. den üblichen Wildtyp-Organismen) führt ein derartiges Vorgehen zum Erlahmen der Cysteinbiosynthese und damit zu einer Wachstumshemmung. Es werden demzufolge keine nicht-proteinogenen Aminosäuren in signifikanten Mengen gebildet.

35 [0022] Da die erfindungsgemäß verwendeten Stämme aber einen deregulierten Cystein-Stoffwechsel und damit einen hohen endogenen Spiegel an O-Acetyl-L-Serin aufweisen, ist die Produktion der nicht-proteinogenen L-Aminosäure in großen Mengen möglich. Gleichzeitig ist noch eine ausreichende Bildung von L-Cystein gewährleistet, um das Zellwachstum des Mikroorganismus zu garantieren.

40 [0023] Bevorzugt verwendet werden Mikroorganismenstämme der Art *Escherichia coli*, die einen deregulierten Cystein-Stoffwechsel besitzen.

[0024] Bevorzugt handelt es dabei sich um *Escherichia coli*-Stämme wie beispielsweise in WO 97/15673 oder in EP 0885962 A1 (entspricht der US Anmeldung mit der Serial Number SN 09/097759) oder in DE 19949579 beschreiben. Nach den in diesen Patentanmeldungen beschriebenen Verfahren kann in beliebigen Stämmen durch Transformation mit einem Plasmid, das z.B. ein feedbackresistentes *cysE*-Allel und/oder ein Efflux-Gen trägt, der Cystein-Stoffwechsel dereguliert werden.

45 [0025] Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der nicht-proteinogenen L-Aminosäuren mit Hilfe eines Mikroorganismenstammes wird in einem Fermenter in an und für sich bekannter Art und Weise aber unter zusätzlicher Zugabe einer nukleophilen Verbindung durchgeführt.

50 [0026] Die Anzucht des Mikroorganismenstammes im Fermenter erfolgt als kontinuierliche Kultur, als batch-Kultur oder vorzugsweise als fed-batch-Kultur. Besonders bevorzugt werden eine C-Quelle und eine nukleophile Verbindung während der Fermentation kontinuierlich zudosiert.

[0027] Die Dosierung der nukleophilen Verbindung beginnt nach dem Animpfen oder vorzugsweise nach einer Anwachphase. Besonders bevorzugt beginnt die Dosierung 6-8 Stunden nach dem Beginn der Fermentation und dauert bis zum Ende der Fermentation.

55 [0028] Die Menge an zugegebener nukleophiler Verbindung hängt von ihrer Toxizität für den Mikroorganismus ab und bewegt sich im Bereich von 10 bis 1000 mmol pro Liter Anfangsvolumen des Fermentationsmediums. Besonders bevorzugt ist eine Dosierung von 50 bis 500 mmol pro Liter Anfangsvolumen des Fermentationsmediums.

[0029] Als C-Quellen für die Fermentation dienen vorzugsweise Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren. Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren als C-Quellen Glukose,-Laktose oder Glycerin einge-

setzt.

[0030] Bevorzugt ist die Dosierung von Glukose in einer Form, die gewährleistet, dass der Gehalt im Fermenter während der Fermentation in einem Bereich von 0,1 - 50 g/l gehalten wird. Besonders bevorzugt ist ein Bereich von 0,5 - 10 g/l.

5 [0031] Als N-Quelle werden im erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise Ammoniak, Ammoniumsalze oder Proteinhydrolysat verwendet.

[0032] Als weitere Medienzusätze können Salze der Elemente Phosphor, Schwefel, Chlor, Natrium, Magnesium, Stickstoff, Kalium, Calcium, Eisen und in Spuren (d.h. in μM Konzentrationen) Salze der Elemente Molybdän, Bor, Kobalt, Mangan, Zink und Nickel zugesetzt werden.

10 [0033] Des Weiteren können organische Säuren (z.B. Acetat, Citrat), Aminosäuren (z.B. Isoleucin) und Vitamine (z. B. B1, B6) dem Medium zugesetzt werden.

[0034] Als komplexe Nährstoffquellen können z.B. Hefeextrakt, Maisquellwasser, Sojamehl oder Malzextrakt zum Einsatz kommen.

15 [0035] Der pH-Wert des Fermentationsmediums liegt im Bereich von 4-10. Bevorzugt ist ein Bereich von 6-8. Besonders bevorzugt ist ein pH-Bereich von 6,5 bis 7,5.

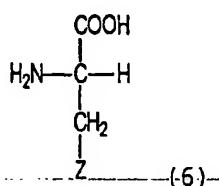
[0036] Die Inkubationstemperatur beträgt 15 - 45 °C. Bevorzugt ist eine Temperatur zwischen 30 - 37 °C.

[0037] Die Fermentation wird vorzugsweise unter aeroben Wachstumsbedingungen durchgeführt. Der Sauerstoff-
20 Intrag in den Fermenter erfolgt mit Pressluft oder mit reinem Sauerstoff.

[0038] Mikroorganismen, die nach dem beschriebenen Verfahren fermentiert werden, sezernieren in einer Fermentationszeit von 1 bis 4 Tage die entsprechenden nicht-proteinogenen L-Aminosäuren mit hoher Effizienz in das Kulturmedium.

25 [0039] Bei Zufuhr einer nukleophilen Substanz sezernieren Mikroorganismen mit dereguliertem Cystein-Stoffwechsel während der Fermentation nicht-proteinogene Aminosäuren der allgemeinen Formel (6) in L-Konfiguration:

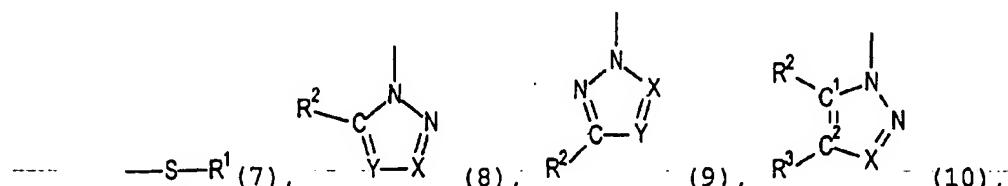
25



35

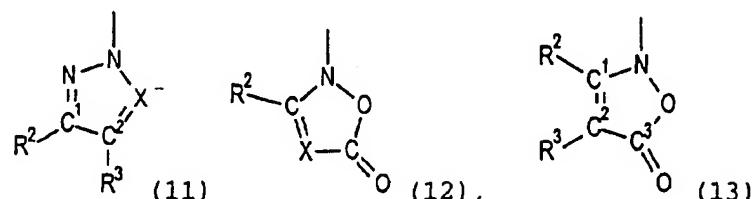
wobei Z ein einwertiger Rest ausgewählt aus den Formeln (7) bis (13) ist

40



45

50

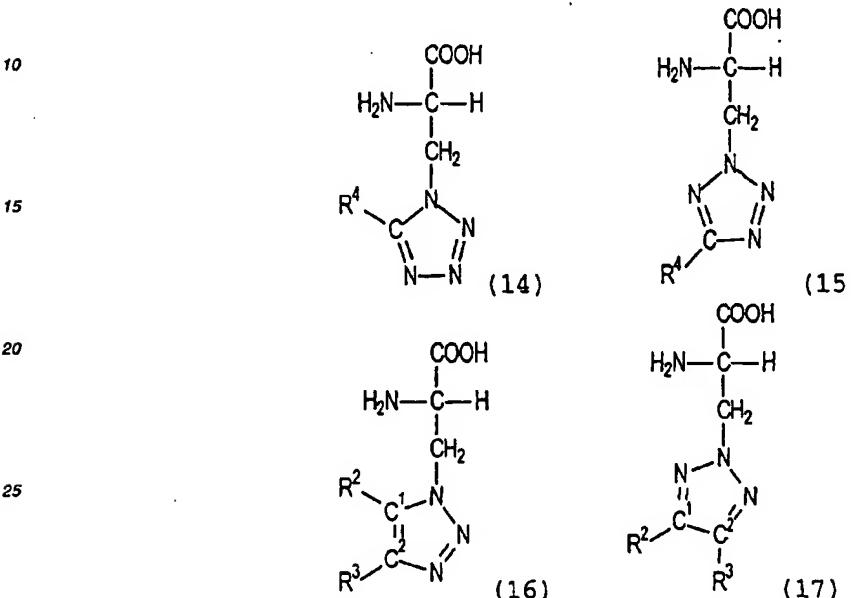


55

sowie deren Ester, Ether oder Salze ist,

und R¹, R², R³, R⁴, X und Y die bereits zu den Formeln (1) bis (5) genannte Bedeutung haben.

[0040] Das erfindungsgemäßen Verfahren ermöglicht es erstmals Verbindungen der Gruppe 1,2,3,4-Tetrazolyl-L-alanin und seiner Derivate sowie 1,2,3-Triazolyl-L-alanin und seiner Derivate herzustellen. Vorzugsweise handelt es sich jeweils um die isomeren Formen 1,2,3,4-Tetrazol-1-yl-L-alanin (14) bzw. 1,2,3,4-Tetrazol-2-yl-L-alanin (15) und deren Derivate einschließlich deren Ester, Ether oder Salze, sowie um 1,2,3-Triazol-1-yl-L-alanin (16) bzw. 1,2,3-Triazol-2-yl-L-alanin (17) und deren Derivate einschließlich deren Ester, Ether oder Salze,



wobei R¹, R², R³ und R⁴ die bereits zu den Formeln (1) bis (5) genannte Bedeutung haben.

[0041] Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht es außerdem, erstmals Verbindungen der Gruppe S-Heteraryl-L-cysteine herzustellen. Dabei handelt es sich jeweils um Aminosäurenverbindungen mit freien Amino- bzw. Carbonsäure-Funktionalitäten. Unter S-Heteraryl-L-cysteinen sind Cystein-Derivate zu verstehen, die durch Substitution eines Restes R⁷ am S-Atom charakterisiert sind. Dabei steht R⁷ für einen Heteraryl-Rest, der aromatischen Charakter hat, mono- oder bicyclisch ist und neben Kohlenstoffatomen mindestens ein Heteroatom in einem Ring trägt. Beispiele für Heteroatome sind Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel. Der Heterarylrest kann seinerseits mit einem Rest R⁴ substituiert sein, wobei R⁴ die zu Formel (2) genannte Bedeutung hat.



[0042] Beispiele für Heterarylreste sind Pyrrolyl, Imidazolyl, Pyrazolyl, Triazolyl, Tetrazolyl, Thienyl, Thiazolyl, Oxa-zolyl, Furanyl, Pyridyl, Pyrimidyl, Pyrazinyl, Benzimidazolyl, Benzotriazolyl, Benzoxazolyl, Benzothiazolyl oder Purinyl.

[0043] Die Erfindung betrifft daher die genannten Verbindungen.

[0044] Besonders bevorzugte Verbindungen sind:

- 1,2,3,4-Tetrazol-1-yl-L-alanin (R⁴ = H),
- 1,2,3,4-Tetrazol-2-yl-L-alanin (R⁴ = H),

- 1,2,3-Benzotriazol-1-yl-L-alanin (R^2 und R^3 sind gleich und bedeuten $[-CR^5=CR^6-]$, wobei R^5 und R^6 gleich H sind und R^2 und R^3 zu einem aromatischen Ring verknüpft sind),
- 1,2,3-Benzotriazol-2-yl-L-alanin (R^2 und R^3 sind gleich und bedeuten $[-CR^5=CR^6-]$, wobei R^5 und R^6 gleich H sind und R^2 und R^3 zu einem aromatischen Ring verknüpft sind),
- 5 - - 5-Carboxy-1,2,3-benzotriazol-1-yl-L-alanin (R^2 und R^3 sind verschieden und bedeuten $[-CR^5=CR^6-]$, wobei R^5 und R^6 im Falle von R^3 gleich H sind und im Falle von R^2 R^5 gleich H und R^6 gleich -COOH ist, und R^2 und R^3 zu einem aromatischen Ring verknüpft sind)
- 5-Carboxy-1,2,3-benzotriazol-2-yl-L-alanin (R^2 und R^3 sind verschieden und bedeuten $[-CR^5=CR^6-]$, wobei R^5 und R^6 im Falle von R^3 gleich H sind und im Falle von R^2 R^5 gleich H und R^6 gleich -COOH ist, und R^2 und R^3 zu einem aromatischen Ring verknüpft sind)
- 10 - 1,2,4-Triazol-3-yl-L-cystein
- Thiazol-2-yl-L-cystein
- Imidazol-2-yl-L-cystein
- Thien-2-yl-L-cystein
- 15 - Pyridin-2-yl-L-cystein
- Pyrimidin-2-yl-L-cystein
- Benzothiazol-2-yl-L-cystein
- Benzoxazol-2-yl-L-cystein.

20 [0045] Vorzugsweise wird das Produkt nach Abtrennen der Biomasse mittels bekannter Methoden (z.B. Filtration, Zentrifugation) aus dem Kulturüberstand isoliert. Solche Methoden zur Isolierung von Aminosäuren sind dem Fachmann ebenfalls bekannt. Sie umfassen z.B. Extraktion, Adsorption, Ionenaustauscher-Chromatographie, Präzipitation, Kristallisation.

[0046] Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung. Der Bakterienstamm *Escherichia coli* 25 W3110 / pA-CYC184-cysEX-GAPDH-ORF306, der für die Ausführung der Beispiele verwendet wurde, wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38142 Braunschweig) unter der Nummer DSM 13495 gemäß Budapest Vertrag hinterlegt.

Beispiel 1: Vorkultur des Produktionsstammes

30 [0047] Als Vorkultur für die Fermentation wurden 20 ml LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl), das zusätzlich 15 mg/l Tetracyclin enthielt, mit dem Stamm W3110 / pA-CYC184-cysEX-GAPDH-ORF306 (beschrieben in EP 0885962 A1, entspricht der US Anmeldung mit der Serial Number SN 09/097759 (hereby incorporated by reference)) beimpft und bei 30 °C und 150 rpm in einem Schüttler inkubiert. Nach sieben Stunden wurde der gesamte 35 Ansatz in 100 ml SM1-Medium (12 g/l K₂HPO₄; 3 g/l KH₂PO₄; 5 g/l (NH₄)₂SO₄; 0,3 g/l MgSO₄ x 7 H₂O; 0,015 g/l CaCl₂ x 2 H₂O; 0,002 g/l FeSO₄ x 7 H₂O; 1 g/l Na₃Citrat x 2 H₂O; 0,1 g/l NaCl; 1 ml/l Spurenelementlösung bestehend aus 0,15 g/l Na₂MoO₄ x 2 H₂O; 2,5 g/l Na₃BO₃; 0,7 g/l CoCl₂ x 6 H₂O; 0,25 g/l CuSO₄ x 5 H₂O; 1,6 g/l MnCl₂ x 4 H₂O; 0,3 g/l ZnSO₄ x 7 H₂O), das mit 5 g/l Glukose; 0,5 mg/l Vitamin B₁ und 15 mg/l Tetracyclin supplementiert wurde, überführt. Die weitere Inkubation erfolgte bei 30 °C für 17 Stunden bei 150 rpm.

Beispiel 2: Fermentative Herstellung von S-[2,3-Dihydroxy-4-mercaptopbutyl]-L-cystein

40 [0048] Als Fermenter diente ein Biostat M-Gerät der Firma Braun Biotech (Melsungen, D) mit einem maximalen Kulturvolumen von 2 l. Mit der in Beispiel 1 beschriebenen Vorkultur (optische Dichte bei 600 nm von ca. 3) wurde der Fermenter mit 900 ml Fermentationsmedium (15 g/l Glukose; 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l (NH₄)₂SO₄; 1,5 g/l KH₂PO₄; 0,5 g/l NaCl; 0,3 g/l MgSO₄ x 7 H₂O; 0,015 g/l CaCl₂ x 2 H₂O; 0,075 g/l FeSO₄ x 7 H₂O; 1 g/l Na₃Citrat x 2 H₂O und 1 ml/l Spurenelementlösung s.o., 5 mg/l Vitamin B₁ und 15 mg/l Tetracyclin, eingestellt auf pH 7,0 mit 25 % Ammoniak) beimpft. Während der Fermentation wurde eine Temperatur von 32 °C eingestellt und der pH-Wert durch Zudosierung von 25 % Ammoniak bei einem Wert von 7,0 konstant gehalten. Die Kultur wurde mit entkeimter Druckluft bei 1,5 vol/vol/min begast und mit einer Rührerdrehzahl von 200 rpm geführt. Nach Absinken der Sauerstoffsättigung auf einen Wert von 50 % wurde die Drehzahl über ein Kontrollgerät bis zu einem Wert von 1200 rpm erhöht, um 50 % Sauerstoffsättigung zu erhalten (Bestimmt mit einer pO₂-Sonde, kalibriert auf 100% Sättigung bei 900 rpm).

[0049] Nach acht Stunden erfolgte eine Zudosierung einer 1 M Dithiothreitol-Lösung mit einer Rate von 2 mmol/h. Glukose wurde aus einer 56 % Stammlösung zugefüttert, sobald der Gehalt im Fermenter von anfänglich 15 g/l auf ca. 5-10 g/l abgesunken war. Die Glukose-Fütterung erfolgte mit einer Flussrate von 8-14 ml/h, wobei die Glukosekonzentration zwischen 0,5 - 10 g/l konstant gehalten wurde. Die Glukose-Bestimmung wurde mit dem Glukoseanalysator der Firma YSI (Yellow Springs, Ohio, USA) durchgeführt.

50 Die Fermentationsdauer betrug 48 Stunden. Nach dieser Zeit wurden Proben entnommen und die Zellen durch Zen-

trifugation vom Kulturmedium abgetrennt. Die resultierenden Kulturüberstände wurden durch reversed phase HPLC an einer LUNA 5 μ C18(2)-Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) aufgetrennt. Als Eluent diente verdünnte Phosphorsäure (0,1 ml konz. Phosphorsäure / 1) bei einer Flußrate von 0,5 ml/min. S-Mercaptodihydroxybutyl-L-cystein wird bei einer Retentionszeit von 86,7 min eluiert. Die Ausbeute betrug 2,5 g/l.

5

Beispiel 3: Fermentative Herstellung von S-Phenyl-L-cystein

[0050] Die Bakterien wurden wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben kultiviert. Nach acht Stunden erfolgte eine Zudosierung einer 1 M Na-Thiophenol-Suspension mit einer Rate von 2 mmol/h.

10

S-Phenyl-L-cystein wird mit der in Beispiel 2 beschriebenen HPLC-Methode bei einer Retentionszeit von 88 min eluiert. Die Ausbeute betrug 2,1 g/l.

Beispiel 4: Fermentative Herstellung von 1,2-Pyrazolyl-L-alanin

15

[0051] Die Bakterien wurden wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben kultiviert. Nach acht Stunden erfolgte eine Zudosierung einer 1 M 1,2-Pyrazol-Lösung mit einer Rate von 4 mmol/h. 1,2-Pyrazolyl-L-alanin wird mit der in Beispiel 2 beschriebenen HPLC-Methode bei einer Retentionszeit von 8,4 min eluiert. Die Ausbeute betrug 6,1 g/l.

20

Beispiel 5: Fermentative Herstellung von 1,2,4-Triazolyl-L-alanin

25

[0052] Die Bakterien wurden wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben kultiviert. Nach acht Stunden erfolgte eine Zudosierung einer 1 M 1,2,4-Triazol-Lösung mit einer Rate von 4 mmol/h. 1,2,4-Triazol-1-yl-L-alanin wird mit der in Beispiel 2 beschriebenen HPLC-Methode bei einer Retentionszeit von 5,8 min eluiert. Die Ausbeute betrug 4,6 g/l.

Beispiel 6: Fermentative Herstellung von 1,2,3,4-Tetrazolyl-L-alanin

30

[0053] Die Bakterien wurden wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben kultiviert. Nach acht Stunden erfolgte eine Zudosierung einer 1 M 1,2,3,4-Tetrazol-Lösung mit einer Rate von 4 mmol/h. Bei der Fermentation entstehen die beiden Isomere 1,2,3,4-Tetrazol-1-yl-L-alanin und 1,2,3,4-Tetrazol-2-yl-L-alanin. Diese werden mit der in Beispiel 2 beschriebenen HPLC-Methode bei einer Retentionszeit von 5,4 bzw. 5,7 min eluiert. Die Ausbeute betrug als Summe der beiden Isomere 3,9 g/l.

35

Beispiel 7: Fermentative Herstellung von 5-Carboxy-1,2,3-benzotriazolyl-L-alanin

40

[0054] Die Bakterien wurden wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben kultiviert. Nach acht Stunden erfolgte eine Zudosierung einer Suspension von 1 M 1,2,3-Benzotriazol-5-carbonsäure in 0,5 M NaOH mit einer Rate von 4 mmol/h. Bei der Fermentation entstehen alle drei Isomere 5-Carboxy-1,2,3-benzotriazol-1-yl-L-alanin, 5-Carboxy-1,2,3-benzotriazol-2-yl-L-alanin und 5-Carboxy-1,2,3-benzotriazol-3-yl-L-alanin, wobei aber das Hauptprodukt 5-Carboxy-1,2,3-benzotriazol-2-yl-L-alanin darstellt. Dieses wird mit der in Beispiel 2 beschriebenen HPLC-Methode bei einer Retentionszeit von 67,5 min eluiert. Die Ausbeute betrug 5,2 g/l.

Beispiel 8: Fermentative Herstellung von 1,2,4-Oxadiazolidin-2,5-dionyl-L-alanin (= Quisqualinsäure)

45

[0055] Die Bakterien wurden wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben kultiviert. Nach acht Stunden erfolgte eine Zudosierung einer 2 M Lösung von 1,2,4-Oxadiazolidin-2,5-dion in Dimethylsulfoxid mit einer Rate von 2 mmol/h. Quisqualinsäure wird mit der in Beispiel 2 beschriebenen HPLC-Methode bei einer Retentionszeit von 5,6 min eluiert. Die Ausbeute betrug 2,2 g/l.

50

Beispiel 9: Isolierung von 1,2-Pyrazolyl-L-alanin aus Fermenterbrühe

55

[0056] Zunächst wurden durch Zentrifugation von 0,6 l Fermenterbrühe bei 5 000 g die Zellen abgetrennt. Der Überstand wurde zur Entfärbung mit 10 g Aktivkohle versetzt, 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert. Die erhaltene Lösung wurde mit 2 M NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt, auf eine Kationenaustauschersäule Amberjet 1200 / H⁺ (Rohm and Haas S.A., Chauny, France; 250 ml Gelbett) aufgetragen und gebundene Substanzen mit 1 M NaCl eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt (500 ml), mit 2 M NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und auf 100 ml eingeeengt. Die Probe wurde für 16 h bei 4 °C gelagert. Das resultierende Kristallset

wurde durch Filtration gewonnen, mit 50 ml Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet.

Beispiel 10: Fermentative Herstellung von S-Thiazol-2-yl-L-cystein

5 [0057] Die Bakterien wurden wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben kultiviert. Nach acht Stunden erfolgte eine Zudosierung einer 1 M 2-Mercaptothiazol-Lösung mit einer Rate von 2 mmol/h. S-Thiazol-2-yl-L-cystein wird mit der in Beispiel 2 beschriebenen HPLC-Methode bei einer Retentionszeit von 33,7 min eluiert. Die Ausbeute betrug 6,1 g/l.

10 **Beispiel 11: Fermentative Herstellung von S-1,2,4-Triazol-3-yl-L-cystein**

[0058] Die Bakterien wurden wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben kultiviert. Nach acht Stunden erfolgte eine Zudosierung einer 1 M 3-Mercaptotriazol-Lösung mit einer Rate von 2 mmol/h. S-Thiazol-2-yl-L-cystein wird mit der in Beispiel 2 beschriebenen HPLC-Methode bei einer Retentionszeit von 8,2 min eluiert. Die Ausbeute betrug 5,5 g/l.

15

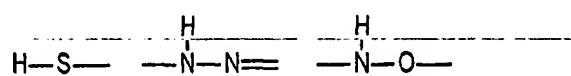
Patentansprüche

20 1. Verfahren zur Herstellung von nicht-proteinogenen L-Aminosäuren durch direkte Fermentation eines an sich bekannten Mikroorganismenstammes mit einem deregulierten Cystein-Stoffwechsel in an sich bekannter Weise, dadurch gekennzeichnet, daß während der Fermentation eine nukleophile Verbindung in derartigen Mengen dem Fermentationsansatz zudosiert wird, daß diese zur Produktion von nicht-proteinogenen L-Aminosäuren durch den Mikroorganismenstamm führt.

25 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß am Ende der Fermentation die nicht-proteinogene L-Aminosäuren aus dem Fermentationsansatz mittels an sich bekannter Methoden abgetrennt wird.

30 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine nukleophile Verbindung die einen Rest ausgewählt aus der Gruppe

35



40

umfasst, zudosiert wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine nukleophile Verbindung ausgewählt aus der folgenden Gruppe zugegeben wird:

- Thiol der allgemeinen Formel (1):



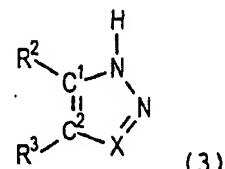
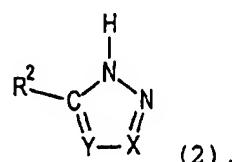
45

wobei R^1 einwertiger substituierter oder nicht substituierter Alkyl-, Alkoxy-, Aryl- oder Heteroarylrest mit maximal 15 C-Atomen bedeutet;

- Azol der allgemeinen Formel (2) oder (3):

50

55



EP 1 191 106 A1

sowie deren Ester, Ether oder Salze,
wobei X und Y gleich oder verschieden sind und CR⁴ oder N bedeuten und R⁴-H, -COOH, -OH, -NH₂, -NO₂, -SH, -SO₃⁻, -F, -Cl, -Br, -I, C₁-C₅-Alkylcarbonyl- oder R¹ bedeutet und R¹ die zu Formel (1) genannte Bedeutung hat und

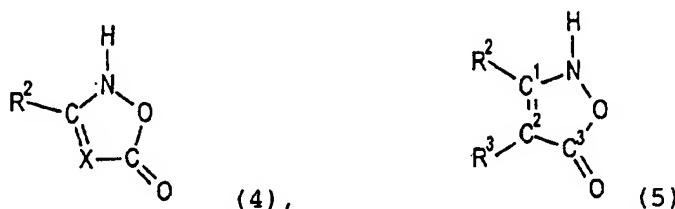
5 wobei R² und R³ gleich oder verschieden sind und R⁴ bedeuten oder wobei C¹ und C² in Formel (3) anstelle der Substituenten R² und R³ mittels einer Brücke [-CR⁵R⁶-]_a mit a gleich 1,2,3 oder 4 zu einem Ring verknüpft sind, wobei

10 R⁵ und R⁶ gleich oder verschieden sind und R⁴ bedeuten und eine oder mehrere nicht benachbarte Gruppen [-CR⁵R⁶-] durch Sauerstoff, Schwefel oder einen ggf. mit C₁-C₅-Alkyl- substituierten Iminorest ersetzt sein können und

15 zwei benachbarte Gruppen [-CR⁵R⁶-] durch eine Gruppe [-CR⁵=CR⁶-] oder durch eine Gruppe [-CR⁵=N-] ersetzt sein können.

- Isoxazolinon der allgemeinen Formel (4) oder (5):

15



25

sowie deren Ester, Ether oder Salze,
wobei X, R¹, R² und R³ die bereits genannte Bedeutung haben und
wobei C¹ und C² in Formel (5) anstelle der Substituenten R² und R³ mittels einer wie für Formel (3) definierten Brücke zu einem Ring verknüpft sein können.

30

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Mikroorganismenstamm ausgewählt aus der Gruppe der folgenden Stämme im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt wird: Stämme mit modifizierten cysE-Allelen; Stämme, die Efflux-Gene enthalten; Stämme mit einer geänderten CysB-Aktivität; Stämme, die unter Einsatz unspezifischer Mutagenese-Methoden kombiniert mit Screening-Methoden für Cystein-Überproduktion oder verminderter Cystein-Abbau gewonnen werden.

35

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroorganismenstamm ein Escherichia coli-Stamm eingesetzt wird.

40

7. Verfahren nach Ansprache 1, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Anzucht des Mikroorganismenstamms im Fermenter als kontinuierliche Kultur, als batch-Kultur oder als fed-batch-Kultur erfolgt.

45

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine C-Quelle und eine nukleophile Verbindung während der Fermentation kontinuierlich zudosiert werden.

50

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Dosierung der nukleophilen Verbindung 6-8 Stunden nach dem Beginn der Fermentation beginnt und bis zum Ende der Fermentation dauert.

55

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Menge an zugegebener nukleophiler Verbindung sich im Bereich von 10 bis 1000 mmol pro Liter Anfangsvolumen des Fermentationsmediums bewegt.

55

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß als C-Quellen Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren eingesetzt werden.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Dosierung der C-Quelle in einer Form erfolgt, die gewährleistet, dass der Glukose-Gehalt im Fermenter in einem Bereich von 0,1 - 50 g/l gehalten wird

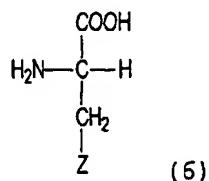
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß als N-Quelle Ammoniak, Ammoniumsalze oder Proteinhydrolysate eingesetzt werden.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert des Fermentationsmediums im Bereich von 4-10 liegt und die Inkubationstemperatur 15 - 45 °C beträgt.

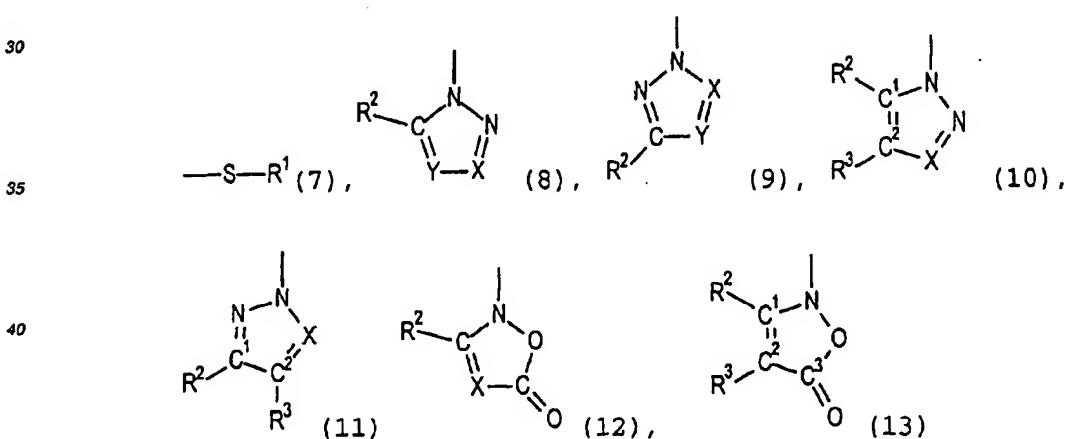
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es unter aeroben Wachstumsbedingungen durchgeführt wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die nicht-proteinogene L-Aminosäure nach Abtrennen der Biomasse aus dem Fermentationsansatz mittels Filtration oder Zentrifugation aus dem Kulturüberstand mittels Extraktion, Adsorption, Ionenaustauscher-Chromatographie, Präzipitation, oder Kristallisation isoliert wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der nicht-proteinogenen L-Aminosäure um eine Aminosäure der allgemeinen Formel (6) in L-Konfiguration:



handelt, wobei Z ein einwertiger Rest ausgewählt aus den Formeln (7) bis (13) ist



sowie deren Ester, Ether oder Salze ist,
und R¹, R², R³, X und Y die bereits zu den Formeln (1) bis (5) genannte Bedeutung haben.

18. Verbindung ausgewählt aus der Gruppe 1,2,3,4-Tetrazolyl-L-alanin und seine Derivate, 1,2,3-Triazolyl-L-alanin und seine Derivate und S-Heteroaryl-L-cysteine.

19. Verbindung gemäß Anspruch 18 ausgewählt aus der Gruppe: 1,2,3,4-Tetrazol-1-yl-L-alanin, 1,2,3,4-Tetrazol-2-yl-L-alanin, 1,2,3-Benzotriazol-1-yl-L-alanin, 1,2,3-Benzotriazol-2-yl-L-alanin, 5-Carboxy-1,2,3-benzotriazol-1-yl-L-alanin, 5-Carboxy-1,2,3-benzotriazol-2-yl-L-alanin, 1,2,4-Triazol-3-yl-L-cystein, Thiazol-2-yl-L-cystein, Imidazol-2-yl-L-cystein, Thien-2-yl-L-cystein, Pyridin-2-yl-L-cystein, Pyrimidin-2-yl-L-cystein, Benzothiazol-2-yl-L-cystein und Benzoxazol-2-yl-L-cystein.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 01 12 0750

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE									
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.)						
X, D	<p>SAITO ET AL: "production of plant non-protein amino acids by recombinant enzymes of sequential biosynthetic reactions in bacteria" BIOLOGICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, TOKYO, JP, Bd. 20, Nr. 1, Januar 1997 (1997-01), Seiten 47-53, XP002122799 ISSN: 0918-6158 * das ganze Dokument *</p>	1-17	C12P13/04 C12P13/06 C12P13/12 C07D257/04 C07D249/04 C07D249/08 C07D249/18 C07D275/02 C07D275/04 C07D333/06 C07D233/61 C07D213/04 C07D261/20 C07D239/26						
A	<p>DENK D ET AL: "L-CYSTEINE BIOSYNTHESIS IN ESCHERICHIA COLI: NUCLEOTIDE SEQUENCE AND EXPRESSION OF THE SERINE ACETYLTRANSFERASE (CYSE) GENE FROM THE WILD-TYPE AND A CYSTEINE-EXCRETING MUTANT" JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, READING, GB, Bd. 133, Nr. 3, 1. März 1987 (1987-03-01), Seiten 515-525, XP000617605 ISSN: 0022-1287 * das ganze Dokument *</p>	1-17	RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.) C12P C07D						
A	<p>NAKAMORI ET AL: "overproduction of L-cysteine and L-cystine by Escherichia coli strains with a genetically altered serine acetyltransferase" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, Bd. 64, Nr. 5, Mai 1998 (1998-05), Seiten 1607-1611, XP002115630 ISSN: 0099-2240 * das ganze Dokument *</p>	1-17 -/-							
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Recherchenort</td> <td style="width: 33%;">Abschlußdat. in der Recherche</td> <td style="width: 33%;">Früher</td> </tr> <tr> <td>MÜNCHEN</td> <td>15. November 2001</td> <td>Douschan, K</td> </tr> </table> <p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenbericht</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>				Recherchenort	Abschlußdat. in der Recherche	Früher	MÜNCHEN	15. November 2001	Douschan, K
Recherchenort	Abschlußdat. in der Recherche	Früher							
MÜNCHEN	15. November 2001	Douschan, K							



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 01 12 0750

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE									
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)						
A	<p>TOPCZEWSKI ET AL: "Cloning and characterization of the <i>Aspergillus nidulans</i> cysB gene encoding cysteine synthase" CURRENT GENETICS, NEW YORK, NY, US, Bd. 31, Nr. 4, April 1997 (1997-04), Seiten 348-356, XP002109934 ISSN: 0172-8083 * das ganze Dokument *</p> <p>—</p>	1-17							
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; GASKIN, PETER J ET AL: "The C-S lysis of 1-cysteine conjugates by aspartate and alanine aminotransferase enzymes" retrieved from STN Database accession no. 123:163090 XP002182677 siehe Verbindung 399-82-6 * Zusammenfassung * & HUM. EXP. TOXICOL. (1995), 14(5), 422-7 '</p> <p>—</p> <p>—/—</p>	18	<p>RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)</p>						
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Recherchenort</td> <td style="width: 33%;">Abschlußdatum der Recherche</td> <td style="width: 33%;">Prüfer</td> </tr> <tr> <td>MÜNCHEN</td> <td>15. November 2001</td> <td>Douschan, K</td> </tr> </table> <p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>				Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	MÜNCHEN	15. November 2001	Douschan, K
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer							
MÜNCHEN	15. November 2001	Douschan, K							



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 01 12 0750

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrag Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; TAL, ABRAHAM ET AL: "Glutathione conjugation: a detoxification pathway for fenoxaprop-ethyl in barley, crabgrass, oat, and wheat" retrieved from STN Database accession no. 120:99262 XP002182678 siehe Verbindung 150807-93-5 = S-(6-chloro-2-benzoxazolyl)-L-Cystein * Zusammenfassung * & PESTIC. BIOCHEM. PHYSIOL. (1993), 46(3), 190-9 ,</p> <p>—</p> <p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; GRZONKA, Z. ET AL: "Tetrazole analogs of amino acids as a tool in studies of the role of free carboxyl group in biologically active systems" retrieved from STN Database accession no. 88:165656 XP002182679 siehe Verbindung 38764-16-8 = (5-tetrazolyl)-L-alanine * Zusammenfassung * & PEPT., PROC. AM. PEPT. SYMP., 5TH (1977), 153-6. EDITOR(S): GOODMAN, MURRAY; MEIENHOFER, JOHANNES. PUBLISHER: WILEY, NEW YORK, N. Y. ,</p> <p>—</p> <p>—/—</p>	18	
X		18,19	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenart	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
MÜNCHEN	15. November 2001	Douschan, K	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nicht schriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur	<p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>		



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 01 12 0750

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE															
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betittlungsanspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)												
X	<p>DATABASE CA 'Online!' CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; PAL, BIMAL C. ET AL: "Reaction of 5-halocytosine derivatives with cysteine" retrieved from STN Database accession no. 109:190731 XP002182680 siehe Verbindung 117052-50-3 = L-Cystein, S-(4-amino-1,2-dihydro-1-methyl-2-oxo-5-pyrimidinyl)- * Zusammenfassung * & NUCLEOSIDES NUCLEOTIDES (1988), 7(1), 1-21 ,</p> <p>—</p> <p>DATABASE CA 'Online!' CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; VOTRUBA, IVAN ET AL: "Conversion of 2-mercaptopurine into S-(pyrimidin-2-yl)cysteine in growing Escherichia coli cells" retrieved from STN Database accession no. 77:70746 XP002182681 siehe Verbindung 35608-73-2 * Zusammenfassung * & FEBS (FED. EUR. BIOCHEM. SOC.) LETT. (1972), 22(3), 287-8 ,</p> <p>—</p> <p>—/—</p>	18													
X		18,19	<p>RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)</p>												
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p> <table border="1"> <tr> <td>Rechenenort: MÜNCHEN</td> <td>Abschlußdatum der Recherche: 15. November 2001</td> <td>Prüfer: Douschan, K</td> </tr> <tr> <td colspan="3">KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtchriftliche Offenbarung P : Zwischenfikatur </td> </tr> <tr> <td colspan="3"> T : der Erfindung zugrunde liegende Theorie oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitg. led der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument </td> </tr> </table>				Rechenenort: MÜNCHEN	Abschlußdatum der Recherche: 15. November 2001	Prüfer: Douschan, K	KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtchriftliche Offenbarung P : Zwischenfikatur			T : der Erfindung zugrunde liegende Theorie oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitg. led der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		
Rechenenort: MÜNCHEN	Abschlußdatum der Recherche: 15. November 2001	Prüfer: Douschan, K													
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE															
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtchriftliche Offenbarung P : Zwischenfikatur															
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorie oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitg. led der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument															



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 01 12 0750

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE															
Kategorie	Kernzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)												
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; PAL, BIMAL C. ET AL: "Reaction of 5-halocytosine derivatives with cysteine" retrieved from STN Database accession no. 109:190731 XP002182682 siehe Verbindung 117052-50-3 = L-Cystein, S-(4-amino-1,2-dihydro-1-methyl-2-oxo-5-py rimidinyl)- * Zusammenfassung * & NUCLEOSIDES NUCLEOTIDES (1988), 7(1), 1-21 ,</p> <p>—</p> <p>X US 5 646 167 A (CIBA-GEIGY CORP.) 8. Juli 1997 (1997-07-08) * Spalte 58, Zeile 1 *</p> <p>—</p> <p>X DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; WISLOCKI, PETER G. ET AL: "Drug residue formation from ronidazole, a 5-nitroimidazole. VI. Lack of mutagenic activity of reduced metabolites and derivatives of ronidazole" retrieved from STN Database accession no. 101:71202 XP002182683 siehe Verbindung 91260-85-4 * Zusammenfassung * & CHEM.-BIOL. INTERACT. (1984), 49(1-2), 27-38 ,</p> <p>—</p> <p>—/—</p>	18													
		18,19													
		18	RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.7)												
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p> <table border="1"> <tr> <td>Recherchenort MÜNCHEN</td> <td>Abschlußdatum der Recherche 15. November 2001</td> <td>Prüfer Douschan, K</td> </tr> <tr> <td colspan="3">KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur </td> </tr> <tr> <td colspan="3"> T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument I : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument </td> </tr> </table>				Recherchenort MÜNCHEN	Abschlußdatum der Recherche 15. November 2001	Prüfer Douschan, K	KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument I : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		
Recherchenort MÜNCHEN	Abschlußdatum der Recherche 15. November 2001	Prüfer Douschan, K													
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE															
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur															
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument I : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument															



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 01 12 0750

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE									
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)						
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL-ABSTRACTS-SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; GIRARD, MICHEL ET AL: "5-Nitroimidazoles. II. Unexpected reactivity of ronidazole and dimetridazole with thiols" retrieved from STN Database accession no. 120:271118 XPO02182684 siehe Verbindung 152647-55-7 = L-Cystein, S-(1,2-dimethyl-1H-imidazol-5-yl)- * Zusammenfassung * & CAN. J. CHEM. (1993), 71(9), 1349-52 ,</p> <p>—</p> <p>X</p> <p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; GASKIN, PETER J ET AL: "The C-S lysis of 1-cysteine conjugates by aspartate and alanine aminotransferase enzymes" retrieved from STN Database accession no. 123:163090 XPO02182685 * Zusammenfassung * & HUM. EXP. TOXICOL. (1995), 14(5), 422-7 ,</p> <p>siehe Verbindung 399-82-6</p> <p>—</p> <p>—/—</p>	18							
		18,19	RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.7)						
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Rechercherort</td> <td style="width: 33%;">Abschlußdatum der Recherche</td> <td style="width: 33%;">Präfer</td> </tr> <tr> <td>MÜNCHEN</td> <td>15. November 2001</td> <td>Douschan, K</td> </tr> </table> <p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>				Rechercherort	Abschlußdatum der Recherche	Präfer	MÜNCHEN	15. November 2001	Douschan, K
Rechercherort	Abschlußdatum der Recherche	Präfer							
MÜNCHEN	15. November 2001	Douschan, K							



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 01 12 0750

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.)
X, P	<p>DATABASE CA 'Online!' CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; SAGIYAN, A. S. ET AL: "Novel approach to asymmetric synthesis of non-proteinogenic heterocyclic L.-alpha.-amino acids" retrieved from STN Database accession no. 135:19890 XP002182686 siehe Verbindung 342047-43-2 = L-Cystein, S-'5-(3-hydroxypropyl)-4-(2-propenyl)-4H-1 ,2,4-trizol-3-yl- * Zusammenfassung * & KHIM. ZH. ARM. (2000), 53(3-4), 118-120</p> <p>-----</p>	18	
RECHERCHIERTE BACHGEBIETE (Int.Cl.)			

Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
MÜNCHEN	15. November 2001	Douschan, K	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		<p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldeatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>	
<p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p>			

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 01 12 0750

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

15-11-2001

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5646167 A	08-07-1997	5552419 A	03-09-1996
		5506242 A	09-04-1996
		5455258 A	03-10-1995
		6124996 A	30-12-1996
		9640101 A1	19-12-1996
		5817822 A	06-10-1998
		5672615 A	30-09-1997
		196762 T	15-10-2000
		692553 B2	11-06-1998
		2536995 A	19-01-1996
		2192092 A1	04-01-1996
		69519024 D1	09-11-2000
		69519024 T2	17-05-2001
		766672 T3	27-12-2000
		0766672 A1	09-04-1997
		2151599 T3	01-01-2001
		965156 A	20-12-1996
		76548 A2	29-09-1997
		9600214 A1	04-01-1996
		114171 A	28-01-2001
		11505502 T	21-05-1999
		965568 A	17-02-1997
		766672 T	28-02-2001
		9505206 A	27-12-1995
		159012 T	15-10-1997
		684255 B2	11-12-1997
		5265593 A	04-05-1995
		1100131 A3	14-03-2000
		2112779 A1	07-07-1994
		69314456 D1	13-11-1997
		69314456 T2	26-02-1998
		606046 T3	04-05-1998
		0606046 A1	13-07-1994
		2107648 T3	01-12-1997
		940012 A	07-07-1994
		3025611 T3	31-03-1998
		1002633 A1	04-09-1998
		70536 A2	30-10-1995
		108229 A	30-10-1998
		2951527 B2	20-09-1999
		6256293 A	13-09-1994
		9400276 A1	29-07-1994
		940038 A ,B,	07-07-1994
		250517 A	26-10-1995
		42933 A1	17-10-1997
		9400048 A	11-08-1994

EPO-FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82